动 物 学 研 究 2001, Jun. 22 (3): 238～241 CN 53－1040/Q ISSN 0254－5853
Zoological Research

简 报

鲤鱼微卫星分子标记的筛选

魏东旺[①] 楼允东[①] 孙效文[②] 沈俊宝[②]
(①上海水产大学渔业学院 上海 200090) (②中国水产科学院黑龙江水产研究所 哈尔滨 150070)

关键词：鲤鱼；微卫星；分子标记
中图分类号：Q959.46+8，Q71 **文献标识码**：A **文章编号**：0254－5853(2001)03－0238－04

收稿日期：2001－01－02；修改稿收到日期：2001－02－28
基金项目：本研究为国家高技术发展计划资助项目(课题编号：101－05－02－01)，在农业部北方鱼类生物工程育种重点实验室完成

(上接237页)

fect of body mass upon flight speed and predation risk in birds[J]. *Anim. Behav.*, **56**: 883－889.
Weathers W W, Seymour R S, Baudinette R V, 1993. Energetics of mound-tending behaviour in the Malleefowl, *Leipoa ocellata* (Megapodiidae)[J]. *Anim. Behav.*, **45**: 333－341.
Widemo F, 1998. Alternative reproductive strategies in the ruff, Philomachus Pugnax: a mixed ESS[J]. *Anim. Ecology*., **56**: 329－336.
Wiens J A, Farmer A H, 1996. Population and community energetics[A]. In: Carey C. Avian Energetics and Nutritional Ecology[M]. New York: Chapman & Hall. 497－526.
Williams G C, 1966. Natural selection, the costoff reproduction, and a refinement of Lack's principle[J]. *Am. Nat.*, **100**: 687－690.
Wolf L L, 1975. Energy intake and expenditures in a nectar-feeding sunbird[J]. *Ecology*, **56**: 92－104.
Wright D H, Currie D J, Maurer B A, 1993. Energy supply and patterns of species richness on local and regional scales[A]. In: Ricklefs R E, Schluter D. Species Diversity in Ecological Communities[M]. Chicago: The University of Chicago Press. 66－74.
Ydenberg R C, Welham C V J, Schmid-Hempel R, 1994. Time and energy constraints and the relationship between the currencies in foraging theory[J]. *Behav. Ecol.*, **5**: 28－34.
Zhang X A, Deng H L, 1991. Primary analysis of clutch size and breeding strategy for passerine birds in alpine meadow[J]. *Alpine Meadow Ecosystem*, **3**: 189－197. [张晓爱, 邓合黎, 1991. 高寒草甸雀形目鸟类的窝卵数及其繁殖对策的初步分析. 高寒草甸生态系统, **3**: 189～197.]
Zhang X A, Deng H L, 1994. A Principle of energy allocation and reproduction in birds[A]. In: Wang Z W. Energy Ecology: Theory, Method and Practice[M]. Changchun: Jilin Sciences & Technology Press. 171－176. [张晓爱, 邓合黎, 1994. 能量分配原理与鸟类的繁殖. 见：王祖望. 能量生态学——理论·方法与实践. 长春：吉林科学技术出版社. 171～176.]
Zhang X A, Zhao L, Liu Z H, 2000. Breeding productivity of passerine birds in alpine meadow in northern Qinghai[J]. *Acta. Zool. Sin.*, **46**(3): 265－270. [张晓爱, 赵 亮, 刘泽华, 2000. 青海省海北地区高寒草甸雀形目鸟类的繁殖生产力. 动物学报, **46**(3): 265～270.]

Several Basis Problems of Avian Ecological Energetics

ZHANG Xiao-Ai ZHAO Liang
(*Northwest Plateau Institute of Biology, the Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, China*)
XU Zhi-Qing
(*Chongqing Natural Museum, Chongqing 407000, China*)

Abstract: Ecological energetics involves the application of energetics to address questions of interest to population biologists. These questions cover a variety of topics, ranged from the adaptive significance of sex, life history evolution, behavioral allocation and trade-off to reproductive and mating systems or foraging strategies. This review has following parts: principles of evolutionary optimization, the relationship between energy expenditure and fitness, the approaches of describing life history, how could energy budget be regularized by supply or demand, the links of energy with structure and function, energy and foraging theory, and energy allocation and sexual selection.

Key words: Birds; Ecological energetics; Fitness; Optimization; Life history; Evolution

微卫星(microsatellite)是近十几年来发展起来的一种新的分子标记,它是指以少数几个核苷酸(1～6个)为单位多次重复的简单序列,以双核苷酸重复最为常见,而其中又以$(CA/GT)_n$居多。由于微卫星在真核生物基因组中是随机分布的,而作为分子遗传标记又有着非常高的多态性和共显性,因此在构建遗传连锁图谱时备受青睐(Brook *et al*., 1994)。目前,在人类和多种动物中已经构建了以微卫星为主的遗传连锁图谱。但在鲤鱼等水产动物的遗传连锁图谱中,微卫星分子标记还较少(孙效文和梁利群,2000)。为了摸索一套筛选鲤鱼微卫星的方法,并进一步丰富已经获得的鲤鱼遗传连锁图谱,我们通过构建鲤鱼基因文库,利用$(CA)_{15}$作为探针,筛选了22个微卫星,在测定DNA序列的基础上,设计并合成了其中17个微卫星的引物,这些引物在鲤鱼中均能扩增出目的条带。

1　材料和方法

1.1　鲤鱼部分基因文库的构建

1.1.1　质粒pGEM-3Zf(+)的提取和酶切　碱裂解法抽提质粒pGEM-3Zf(+),然后用限制性内切酶*BamH* I进行酶切,再用小牛肠碱性磷酸单酯酶CIAP去除其5'端磷酸。

1.1.2　鲤鱼总DNA的提取和酶切　本实验所用的鲤鱼为黑龙江野鲤(*Cyprinus carpio haematopterus* Temminck *et* Sehlegel),采自黑龙江抚远县江段。称取野鲤肝脏0.1 g,加入0.5 mL裂解液(0.5%的十二肌胺酸钠、200 μg/mL蛋白酶K、0.5 mol/L EDTA),50℃温育1～2 h。然后用酚、酚和氯仿、氯仿各抽提1遍,乙醇沉淀后,再用70%乙醇洗1次。自然干燥,加100 μL 0.1×TE溶解。取5 μg野鲤总DNA,用5～8单位的限制性内切酶*Sau*3*A* I酶切,使切出的片段大部分在150～1 500 bp之间,乙醇沉淀回收。

1.1.3　连接及转化　取300 ng质粒DNA,80 ng酶切后的鲤鱼DNA,加入T4 DNA连接酶1个单位,加无菌水补足50 μL,12～16℃反应约15 h。感受态细胞的制备参照《Molecular Cloning》(Sambrook *et al*., 1989)。取5 μL连接液进行转化,最后涂到事先制备好的含有100 μg/mL的氨苄青霉素的LB平板上,平板表面涂有X-Gal和IPTG,每个平板上菌落控制在600以内。

1.2　微卫星$(CA)_n$的筛选

1.2.1　杂交膜的制备　由于白色菌落占的比例不高(约50%),因此用无菌牙签把白色菌落转移到底部画有方格线的新的平板上,每个平板上约400个菌落。杂交膜为硝酸纤维素滤膜,直径与平板的内径相同。杂交膜的制备参照《Molecular Cloning》(Sambrook *et al*., 1989)。每个平板影印1张杂交膜,并作好一致的方位标记,影印后的平板放于37℃培养箱中直到重新长出菌落。

1.2.2　探针的制备　取人工合成的CA重复15次的序列$(CA)_{15}$20 pmol,T4多核苷酸激酶2个单位,最后加入γ^{32}P-ATP 50 μCi,反应体积50 μL,37℃水浴1 h。通过自制的Sephadex G-50凝胶柱回收探针标记液。

1.2.3　杂交　取1支干净的杂交瓶,依次放入杂交膜,25 mL 50℃预热的杂交液(0.25 mol/L NaCl、0.125 mol/L Na_2HPO_4、1 mmol/L Tris·HCl pH7.4、0.7%SDS、10% PEG-6000),以及煮沸变性的小牛胸腺DNA 2.5 μg,50℃预杂交2 h。倒出预杂交液,加入25 mL 50℃预热的杂交液,再加入终浓度为1～1.5×10^6 cpm/mL的探针$(CA)_{15}$,50℃杂交12～16 h。依次用2×SSC(含0.1%SDS)、0.1×SSC(含0.1%SDS)、0.1×SSC(不含0.1%SDS)在50℃各洗涤15 min。暗室中压上X光底片,-70℃放射自显影约16 h(徐磊等,1997)。

1.2.4　阳性克隆的挑取　按照原先确定的方位,将X光底片、硝酸纤维素滤膜和模板平板3者对照,在相同的位置上挑出阳性克隆,并转移到新的平板上。

1.3　DNA测序

碱裂解法抽提并纯化含$(CA)_n$的质粒DNA,利用ABI 377 DNA序列自动分析仪进行测序,测序试剂盒为BigDye™ Terminator Sequencing Ready Reaction DNA Sequencing Kit。

2　结果及分析

利用探针$(CA)_{15}$对2000个白色菌落进行筛选,共获得阳性克隆45个(2.25%)。除了13个克隆信号较弱或不含微卫星以外,在其余32个克隆中共得到22个微卫星,其中$(GT/CA)_n$19个,占86.4%。这些微卫星可以分成3类:完美型、非完美型和混合型,分别占63.6%、22.7%和13.7%。另外,重复次数在6～11的微卫星最多,占36.4%,而30次以上的较少,只占4.5%(表1)。

在22个微卫星中，除了5个因两端序列太短而不能设计引物之外，对其余17个在网上使用麻省理工学院白头研究所的Primer3软件设计引物，然后在上海生工生物工程公司合成，并对黑龙江野鲤种群进行了PCR扩增。PCR程序为：95℃变性3 min；92℃ 30 s，50～53℃ 30 s，72℃ 30 s，38个循环；72℃延伸5 min，结果都扩增出了目的条带。这些微卫星引物的序列、大小以及退火温度见表2。

表1 鲤鱼微卫星的不同类型重复序列和重复次数所占比例

Table 1 Percentage of various repeat sequence type and repeat numbers of microsatellite in common carp

微卫星数目（microsatellite number）	22				
微卫星类型（repeat sequence type）	完美型（perfect）		非完美型（imperfect）		混合型（compound）
	63.6%		22.7%		13.7%
重复次数（repeat number）	6～11	12～17	18～23	24～29	>30
	36.4%	22.7%	22.7%	13.6%	4.5%

表2 鲤鱼微卫星分子标记及其引物

Table 2 Microsatellite markers and their primers in common carp

微卫星标记（microsatellite marker）		引物序列（primer sequence）	大小/bp（size）	重复序列（repeat sequence）	退火温度/℃（annealing temperature）
HLJ 001	P	GCTTGATTGCAGAAGCCAAT	124	$(TG)_8$	50
	R	TCCTCGATGGTAGAGGGTTG			
HLJ 002	P	TCAATTTGCACTTAAGTTTTACCA	192	$(TG)_7$ $(T)_3$ $(TG)_6$	51
	R	CCTGGGGATTTATAGGGTCA			
HLJ 003	P	CATAACCGCTCTGCTGAACA	104	$(GT)_{18}$	51
	R	GGCCTTTAGATCAAGGTCAGG			
HLJ 004	P	TCAAATAGCCTTGGTGAGCTT	195	$(GT)_9$	50
	R	TTCTCCTCTTCAACCCAACG			
HLJ 005	P	GACGTGTGGCCAAGAATTG	200	$(CA)_5TA$ $(CA)_8$	51
	R	CAAGAGCAGCTTCCAAATCC			
HLJ 006	P	TCAGTTCCTCAGAATCCATCG	194	$(GT)_{10}$	50
	R	GGTCCCCATTGACTTCCATA			
HLJ 007	P	TCACGGGCGAAATGTGTTTA	194	$(TG)_{11}$ $(A)_{12}$	52
	R	GTGTGTGGTCCTCCCAAAAG			
HLJ 008	P	GAGACTCAAACCCACAGGAAA	179	$(AT)_{18}$	50
	R	TTTGCAAAATTAAAATGTTTTGTTC			
HLJ 009	P	GGGGTCTGTGTGTTGGTCTT	200	$(TC)_7$ $(AC)_{11}$	51
	R	CGGGGGAAATGTGTTTAAAGT			
HLJ 010	P	TAGTGGGCACTGCAACTGTC	234	$(CAA)_8$	50
	R	CATTCATTGTCATTTTGAGAAAGG			
HLJ 011	P	TTAGCCAGCCAGAGACAAGC	200	$(CA)_{10}$	50
	R	CACTGCCACAAACCCATCTA			
HLJ 012	P	CCAAGTTGGAAACAGTTCTGC	184	$(A)_{31}$	51
	R	CTGACCCCAAATTACTGACCA			
HLJ 013	P	AAAAAGGCTGAAGCAGCAAT	193	$(CA)_{18}$ $(A)_7$	50
	R	GATCAGCCATGTTCAAGGAAG			
HLJ 014	P	TGGGTTTAGGTTTTGGAATGA	188	$(TG)_{10}$ $(T)_5$ $(TG)_4$	50
	R	GGATCACCTACGCACCTTTG			
HLJ 015	P	GATGTCCAACACATGCCTCA	199	$(GT)_8$	50
	R	TTTGGATGTACGCCACGATA			
HLJ 016	P	TGGTCAGTAATTTGGGGTCAG	235	$(T)_{23}$	51
	R	GAGTGGGGAAACAGTTCTGC			
HLJ 017	P	TGTCCGAGTGTTTTTGTCATTC	254	$(AT)_{28}$	50
	R	TGACAACACATTTGCCTCAA			

P：正向引物（forward primer）；R：反向引物（reverse primer）.

3 讨论

由于微卫星在真核生物基因组中分布广泛，并且是随机分布的，可通过检测的阳性克隆的数目来估计 $(CA)_n$ 这类微卫星在整个基因组中的数量。本实验共检测了2 000个克隆，阳性克隆有45个，即每检测44个克隆就有1个阳性克隆。由于每个克隆中的插入片段的平均大小为900 bp，因此可计算出在鲤鱼基因组中大概每40 kb就有1个 $(CA)_n$ 类的微卫星。而整个鲤鱼基因组的大小约为1.0×

10^4，这样在整个基因组中共有 2.5×10^4 个 $(CA)_n$。而根据 Crooijmans *et al*.（1997）对鲤鱼微卫星研究的结果，估计每 30～35 kb 就有 1 个 $(CA)_n$ 类的微卫星，这和本实验得到的数值是一致的。这表明了 $(CA)_n$ 在鲤鱼基因组中分布是非常广泛的，足以满足构建高密度的遗传连锁图谱。

微卫星自 20 世纪 90 年代初用作分子标记以来，已具有越来越广的用途，如用于遗传连锁图谱的构建，种质鉴定、家系分析以及遗传疾病的诊断等（Aliah *et al*.，1999；McConnell *et al*.，1995）。作为第 2 代分子标记的微卫星相对于其他分子标记如 RAPD 和 RFLP 来说，具有较高比例的多态性和共显性，而且它在真核生物的基因组中随机分布并非常广泛，因此非常适合用于遗传连锁图谱的构建。目前，我们已初步构建出了鲤鱼的具有 50 个连锁组的遗传连锁图谱，共有分子标记 262 个，但鲤鱼的微卫星分子标记还比较少，只有 26 个（孙效文和梁利群，2000）。本实验的主要目的就是进一步丰富和完善这个图谱。现在通过构建鲤鱼基因文库和利用放射性标记探针 $(CA)_{15}$ 进行筛选，已经获得了 22 个微卫星，并设计合成了 17 对引物，寻找到了合适的 PCR 扩增条件。下一步将利用这些微卫星标记对用于构建鲤鱼遗传连锁图谱的实验鱼作基因型分析，最终把这些标记定位在鲤鱼的遗传连锁图谱上。同时，这些微卫星标记也可为鲤科鱼类的种间和种群间的进化和遗传多样性研究提供有用的工具。

致　谢　本实验得到黑龙江水产研究所梁利群、阎学春以及李丽坤等老师的大力支持，在此表示感谢。

参　考　文　献

Aliah R S, Takagi M, Dong S *et al*, 1999. Isolation and inheritance of microsatellite markers in the common carp *Cyprinus carpio*[J]. *Fisheries Science*, **65**(2): 235－239.

Brook A L, Cook D, Paul B *et al*, 1994. Organization of microsatellites differs between mammals and cold-water teleost fishes[J]. *Can. J. Fish Aquat. Sci.*, **51**: 1959－1966.

Crooijmans R P M A, Bierbooms V A F, Komen J *et al*, 1997. Microsatellite markers in common carp (*Cyprinus carpio* L.)[J]. *Animal Genetics*, **28**: 129－132

McConnell S, Hamilton L, Morris D *et al*, 1995. Isolation of salmonid microsatellite loci and their application to the population genetics of Canadian east coast stocks of Atlantic salmon[J]. *Aquaculture*, **137**: 19－30.

Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T, 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd edition)[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 60－68.

Sun X W, Liang L Q, 2000. A genetic linkage map of common carp[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 7(1): 1－5［孙效文，梁利群，2000. 鲤鱼的遗传连锁图谱(初报). 中国水产科学，7(1): 1～5］

Xu L, Xia J H, Pan Q *et al*, 1997. Isolation of band-specific $(CA)_n$ microsatellite from human chromosome 8q24.1[J]. *Acta Genetica Sinica*, 24(1): 1－6.［徐　磊，夏家辉，潘　乾等，1997. 人类染色体 8q24.1 带特异性微小卫星 DNA 的筛选. 遗传学报，24(1): 1－6］

Isolation of Microsatellite Markers in the Common Carp (*Cyprinus carpio*)

WEI Dong-Wang[①]　LOU Yun-Dong[①]　SUN Xiao-Wen[②]　SHEN Jun-Bao[②]

(① *Fisheries College, Shanghai Fisheries University, Shanghai* 200090, *China*)

(② *Heilongjiang River Fisheries Research Institute, the Chinese Academy of Fisheries Science, Harbin* 150070, *China*)

Abstract: A partial common carp genomic library was constructed. 45 positive clones were isolated from screening about 2000 clones of the genomic library with a $(CA)_{15}$ probe labelled at the 5′ end with γ^{32}P-ATP. Sequencing of these clones was performed with automated sequencer, and 22 microsatellites were isolated. 17 primers were designed based on unique sequences flanking each motif with the software Primer3. PCR on *Cyprinus carpio haematopterus* was carried out with these primers, and all gave expected bands. Annealing temperature of these primers was between 50℃ and 53℃.

Key words: Common carp; Microsatellite; Molecular marker